

## ترکیبات نیتروژن دار غیر پروتئینی

## (Non-Protein Nitrogenous Compounds)

کاتابولیسیم پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک منجر به تشکیل ترکیباتی تحت عنوان ترکیبات نیتروژن دار غیر پروتئینی (NPN) می-گردد.

بیش از ۱۵ نوع ترکیب ازت دار (نیتروژن دار) غیر پروتئینی (NPN) در پلاسما وجود دارد که مهمترین آنها (به ترتیب کاهش غلظت

Protein	Amino acids	Ammonia	Urea
---------	-------------	---------	------

پلاسمایی) عبارتند از: اوره، اسیدهای آمینه،

اسید اوریک، کراتینین، کراتین و آمونیاک.

جدول زیر ترکیبات نیتروژن دار غیر پروتئینی اصلی، منشاء آنها و موقعیتهایی که در آن سنجش این مواد کاربرد بالینی قابل توجهی

دارد را بصورت خلاصه نشان می دهد. مجموع غلظت ترکیبات نیتروژن دار غیر پروتئینی ۲۵۰-۴۰۰ mg/dl می باشد. قابل توجه اینکه

میزان NPN موجود در خون حدود ۷۵ درصد بیش از NPN پلاسماست که علت عمده آن وجود مقادیر زیاد گلوکاتیون در

اریتروسیتهاست. قسمت عمده NPN

پلاسما را اوره (Urea) تشکیل می دهد که

حدود ۴۵ درصد آن را شامل می شود.

اندازه گیری میزان NPN قبلا به عنوان

شاخصی جهت سنجش کارکرد کلیه بکار

می رفت که اکنون یک شاخص نسبتا غیر

اختصاصی جهت تشخیص بیماریهای کلیه

محسوب می گردد، زیرا سایر بیماریها نیز

می توانند سبب تغییرات مهمی در غلظت

پلاسمایی مواد مختلف شوند (به عنوان

مثال وجود بیماری نقرس، بیماریهای

کبدی و ... سبب تغییر غلظت NPN می گردند). به همین دلیل در آزمایشگاهها اندازه گیری NPN انجام نمی گیرد بلکه به جای آن از

سنجش مقادیر اوره (یا نیتروژن اوره خون یا  $BUN^1$ ) و کراتینین سرم که شاخصهای حساستر و اختصاصی تری می باشد برای نشان دادن

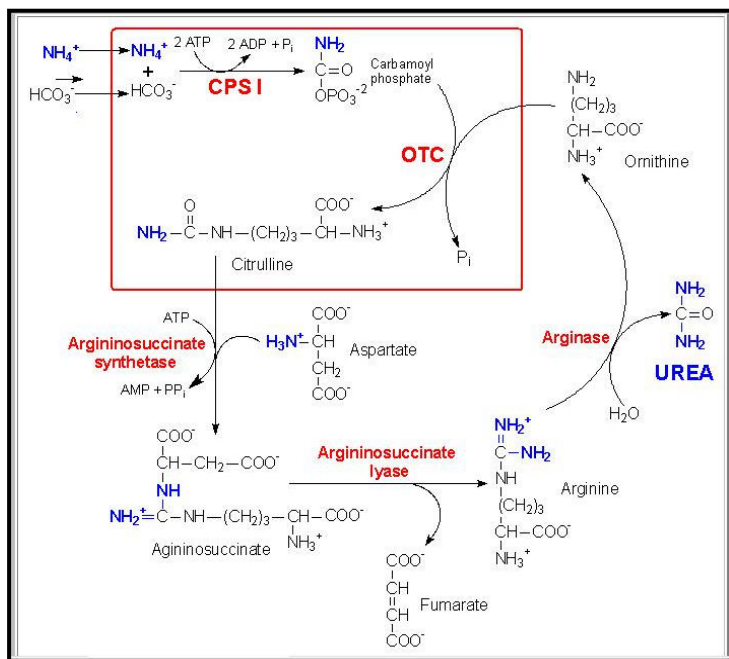
چگونگی کارکرد کلیه استفاده می گردد.

<sup>1</sup>BUN = Blood Urea Nitrogen

Metabolite	Biochemical origin	Clinical utility of measurement	Percent of urine NPN
Amino acids	Proteins: <u>endogenous</u> <u>exogenous</u>	Liver disease: <u>inborn</u> errors of metabolism Tubular disorders	< 1
Ammonia	Amino acids	Liver disease: <u>renal</u> disease, congenital & <u>aquired</u> <u>inborn</u> errors of metabolism	10 - 20
Urea	Ammonia	Liver disease: <u>renal</u> disease	55 - 90
Creatinine	Creatine	Renal function	2 - 3
Uric acid	Purine nucleotides	Marker for cell turnover, disorders of <u>purine</u> synthesis	1 - 1.5

## اوره و نیتروژن اوره خون (Blood Urea Nitrogen) BUN

اوره محصول عمده کاتابولیسم پروتئینها و پورینها بوده که در چرخه اوره (Urea cycle) در کبد و طی واکنشهایی که در دو بخش میتوکندریایی و سیتوزولی صورت میگیرد (شکل زیر) سنتز می گردد و سپس آزادانه بدون مایعات خارج و داخل سلولی انتشار



می یابد (اوره دارای نفوذپذیری بالایی میباشد). اوره عمدتاً از طریق کلیه ها دفع می گردد و مقدار کمی نیز از طریق تعریق ترشح شده و یا توسط باکتریهای روده ای تجزیه می گردد. این ترکیب تقریباً نصف مواد جامد ادرار را تشکیل می دهد و همچنین ۸۰-۹۰ درصد نیتروژن ادراری را تشکیل می دهد. غلظت آن منعکس کننده تعادل بین کاتابولیسم اسیدهای آمینه و دفع آن توسط کلیه می باشد. مقدار طبیعی اوره در سرم ۱۵-۴۵ mg/dl می باشد. فیلتراسیون آن در گلومرولهای کلیوی به راحتی صورت می گیرد. بسته به

وضعیت هیدراتاسیون بدن ۸۰-۴۰ درصد آن از لوله های پروگزیمال (Proximal tubule) به صورت غیرفعال (passive) بازجذب می گردد. مقدار اوره در مردان کمی بیش از مقدار آن در زنان بوده و با گذشت سن به تدریج افزایش می یابد. مقدار آن با یک وعده غذایی پرپروتئین و هورمونهای کاتابولیک (مانند: هورمونهای تیروئیدی و گلوکوکورتیکوئیدی) افزایش محسوسی می یابد و تحت تاثیر هورمونهای آنابولیک (مانند آندروژنها و هورمون رشد) کاهش می یابد.

### ازتمی (Azotemia) و سندرم اورمیک:

افزایش ترکیبات ازته غیر پروتئینی (به ویژه اوره و کراتینین) ، ازتمی نامیده می شود. موارد طولانی مدت و شدید ازتمی که با نیتروژن اوره خون (BUN) فراتر از ۱۰۰ mg/dl و تظاهرات بالینی نارسایی کلیه مشخص می گردد را سندرم اورمیک می نامند. ازتمی ممکن است علل پیش کلیوی (Pre-renal) ، کلیوی (Renal) و پس کلیوی (Post-renal) داشته باشد. از علل پیش کلیوی می توان به افزایش تولید اوره و یا کاهش جریان خون کلیوی اشاره نمود. افزایش تولید اوره به عللی مانند: رژیم پرپروتئین ، افزایش کاتابولیسم پروتئینها ، تحلیل ماهیچه ای و بازجذب پروتئینهای خون به دنبال خونریزی گوارشی می تواند صورت گیرد که عوامل مذکور ممکن است به تنهایی باعث افزایش کمی در میزان سرمی اوره گردد. وجود عوامل و اختلالات دیگری مانند آسیب به پارانشیم کلیه ، انسداد مجاری ادراری و کاهش جریان خون کلیوی (از جمله به علل شوک و کاهش برون ده قلبی Cardiac output) می تواند موجب افزایش بسیار بیشتر اوره سرم گردد. اختلال در جریان خون کلیه منجر به کاهش سرعت فیلتراسیون گلومرولی یا GFR (Glomerular Filtration Rate) می گردد که علل این اختلال در جریان خون کلیه می توان موارد زیر باشد:

- (۱) کاهش نمک و آب بدن (Dehydration) که می‌تواند به علت استفراغ، اسهال، شوک، دیورز شدید و تعریق مفرط باشد.
- (۲) خونریزی شدید از دستگاه گوارش (که طی آن حجم خون کاهش و بازجذب آمینو اسیدها افزایش می‌یابد).
- (۳) کاهش برون‌ده قلبی و نارسایی احتقانی قلبی (Congestive heart failure) و انفارکتوس میوکارد (MI).
- (۴) افزایش کاتابولیسم پروتئینها (در طی دوره تب، استرس و سوختگی).

باتوجه به تمامی موارد مذکور، مشخص می‌گردد که ارتباط خطی بین غلظت اوره (BUN یا BUN) با GFR وجود ندارد که نشاندهنده این موضوع می‌باشد که اوره (BUN) شاخص دقیقی در بررسی عملکرد کلیه نمی‌باشد و ممکن است عوامل پیش‌کلیوی بر روی غلظت آن تاثیر بگذارند. بنابراین ارزیابی اوره (BUN) وقتی ارزشمند است که به همراه ارزیابی میزان کراتینین (Creatinine) صورت گیرد. در این صورت می‌توان فعالیت یا عملکرد کلیه را بهتر مورد آنالیز قرار داد که افتراق ازیمی پیش‌کلیوی و پس‌کلیوی را از یکدیگر میسر می‌سازد. اگر میزان اوره سرم افزایش یابد و تغییری در غلظت کراتینین ایجاد نشده باشد نشانگر ازیمی پیش‌کلیوی می‌باشد. در صورتی که میزان اوره و کراتینین سرم توأم با هم افزایش یابد نوع ازیمی موجود، از نوع کلیوی و پس‌کلیوی خواهد بود. ازیمی کلیوی بیشتر به علت اختلال در عملکرد کلیه (در نارسایی حاد و مزمن کلیه Acute and Chronic Renal Failure) می‌باشد که باعث کاهش GFR و در نتیجه باعث احتباس ترکیبات ازته غیر پروتئینی یا NPN (Non Protein Nitrogen) می‌گردد. ازیمی پس‌کلیوی به علت انسداد در مجاری ادراری و بازجذب اوره به جریان خون و ارتشاح به نسوج نرم اطراف ایجاد می‌گردد. (نکته: اوره از جمله ترکیبات دارای ضریب نفوذپذیری بالا می‌باشد به همین دلیل به راحتی از غشای سلولی عبور می‌نماید).

از جمله علائم آزمایشگاهی مهم سندرم اورمیک می‌توان به این موارد اشاره نمود: اسیدوز متابولیک، عدم تعادل آب و الکترولیت (مانند افزایش فسفات خون، کاهش کلسیم خون، افزایش پتاسیم خون)، افزایش فشار خون، کم‌خونی، غلظتهای افزایش یافته ترکیبات ازته غیر پروتئینی (NPN). که افزایش غلظت ترکیبات ازته غیر پروتئینی (NPN) در سندرم اورمیک با علائمی مانند: ضعف پیشرونده، بی‌اشتهایی، تهوع و استفراغ، تحلیل ماهیچه‌ای، رعشه و اختلالات عصبی و روانی و نیز تنفس تند و سطحی همراه می‌باشد که اگر میزان BUN به بیش از ۲۰۰ mg/dl برسد ایجاد حالت اغما نموده و در نهایت منجر به مرگ خواهد شد.

### علل عمده کاهش اوره خون (BUN):

- (۱) کاهش سنتز اوره؛ که می‌تواند به علت نارسایی و یا آسیب پارانشیم کبد، هپاتیت و عوامل دارویی باشد.

از جمله **هورمونهای آنابولیک**، آندروژنها (تستوسترون و...) و هورمون رشد (GH) را می‌توان نام برد که دارای اثر سنتزی بوده و باعث کاهش BUN می‌گردند در حالی که گلوکوکورتیکوئیدها و هورمونهای تیروئیدی بیشتر دارای اثرات آنتی آنابولیکی یا **کاتابولیکی** (تجزیه‌ای) هستند و باعث افزایش BUN می‌گردند.

- (۲) افزایش سنتز مواد پروتئینی؛ که بیشتر در اواخر دوران بارداری، در آکرومگالی، در اثر هورمونهای آنابولیک و در نوزادان (به طور طبیعی) وجود دارد.

- (۳) رژیم غذایی کم پروتئین و غنی از کربوهیدرات (نیز در سوءتغذیه و سوءجذب).

- (۴) سندرم نفروتیک، نکروز حاد توبولی، ترشح نابجای هورمون ADH، تجویز سرم و مایعات.

## روشهای اندازه گیری مقدار اوره خون:

دو متد کلی برای اندازه گیری مقدار اوره خون وجود دارد:

۱. استفاده از معرفهای آنزیمی (روش غیر مستقیم Indirect method)

الف- روش نسلر (Nessler)

ب- روش برتلوت (Berthelot)

ج- روش گلوتامات دهیدروژناز (GLDH)

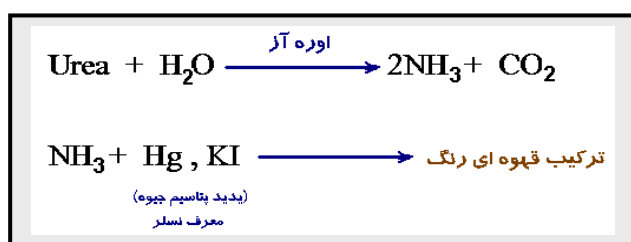
۲. استفاده از معرف شیمیایی (روش مستقیم Direct method)

- روش دی استیل منواکسیم (DAM)

\*\*\*\*\*

## الف- روش نسلر (Nessler)

اوره بر طبق واکنش زیر و تحت تاثیر آنزیم اوره آز (Urease) به آمونیاک ( $\text{NH}_3$ ) و  $\text{CO}_2$  تبدیل می گردد. آمونیاک حاصل با



معرف نسلر که یدیدپتاسیم جیوه (Potassium mercuric iodide)

می باشد وارد واکنش شده و ایجاد ترکیب قهوه ای رنگی می -

نماید که در  $450 \text{ nm}$  دارای ماکزیمم جذب می باشد.

نکته ۱: ایتیمم فعالیت آنزیم اوره آز در دمای  $55^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد

و  $\text{pH} = 7-8$  می باشد.

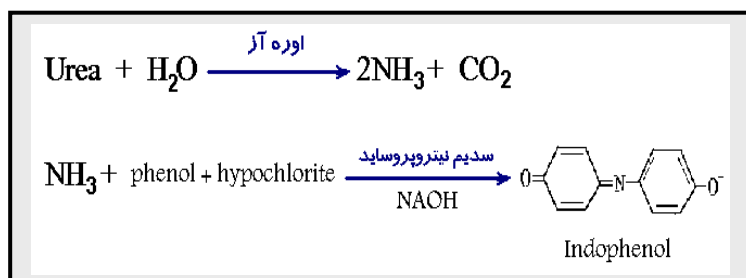
نکته ۲: آنزیم اوره آز توسط یونهای فلوئورید ( $\text{F}^-$ )، سیترات و آمونیوم (در غلظت بالا) مهار می گردد. بنابراین از ترکیبات نگهدارنده و

ضد انعقاد حاوی یونهای فلوئورید ( $\text{F}^-$ )، سیترات نمی توان استفاده نمود.

از معایب این روش می توان به اثر کدورت (Turbidity) نمونه و نیز ناپایداری رنگ ایجاد شده اشاره نمود.

## ب- روش برتلوت (Berthelot)

همانند روش قبل اوره بر طبق واکنش زیر و تحت تاثیر آنزیم اوره آز (Urease) به آمونیاک ( $\text{NH}_3$ ) و  $\text{CO}_2$  تبدیل می گردد.



سپس آمونیاک حاصل با هیپوکلریت سدیم ( $\text{NaOCl}$ ) و

فنل در یک محیط قلیایی ترکیب شده و ایجاد اندوفنل

(Indophenol) آبی رنگ خواهد کرد. در این واکنش

نیتروپروساید سدیم  $[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$  به عنوان

کاتالیزور عمل خواهد نمود. میزان رنگ ایجاد شده به

مقدار اوره بستگی دارد. این روش نسبت به روش نسلر دارای حساسیت بیشتری می‌باشد. با استفاده از این روش می‌توان نیتروژن اوره پلاسما، سرم، ادرار و سایر مایعات بیولوژیکی را اندازه‌گیری نمود.

**نکته ۱:** پروتئین خون باید رسوب داده شود زیرا رنگ هموگلوبین (Hb) بر رنگ تولید شده در واکنش تاثیر می‌گذارد.

**نکته ۲:** در صورت استفاده از خون یا پلاسما نباید از ماده ضد انعقادی که دارای نیتروژن است (مانند: EDTA) استفاده نمود.

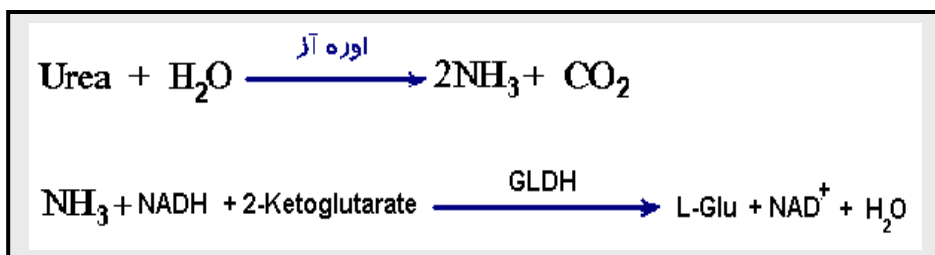
همانند روش نسلر، چون در این روش نیز از آنزیم اوره‌آز استفاده می‌گردد نباید از فلوئورید سدیم (NaF) به عنوان ماده نگهدارنده استفاده نمود.

**نکته ۳:** به علت اینکه ممکن است اوره موجود در نمونه در اثر رشد باکتریها از بین برود باید خون را بلافاصله مورد آزمایش قرار

داد، در غیر این صورت بایستی نمونه در یخچال نگهداری شود که در این حالت برای مدت چند روز پایدار خواهد بود. برای محافظت نمونه می‌توان از تیمول استفاده نمود.

### ج- روش گلوتامات دهیدروژناز (GLDH)

در اینجا نیز مرحله اول واکنش مشابه روشهای آنزیمی قبلی است. ولی در مرحله دوم واکنش  $\alpha$ -کتوگلوئارات به عنوان یکی از

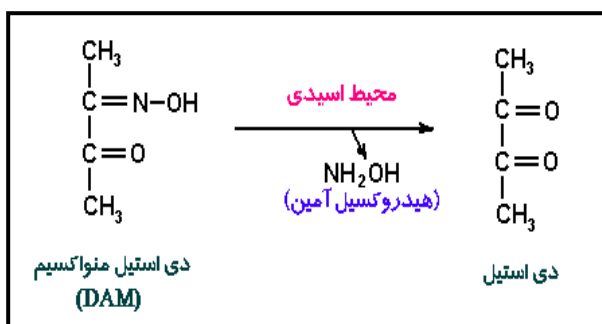


معرفها به همراه معرف آنزیمی گلوتامات دهیدروژناز (GLDH) به محیط واکنش افزوده شده و تحت تاثیر آنزیم مذکور با آمونیاک

حاصل از مرحله اول واکنش ترکیب شده و ایجاد گلوتامات خواهد نمود. آنزیم گلوتامات دهیدروژناز (GLDH) نیازمند کوآنزیم NADH برای عمل خود می‌باشد. بنابراین از تغییر جذب مربوط به تبدیل NADH به  $\text{NAD}^+$  در طول موج ۳۴۰ nm می‌توان به عنوان معیاری برای سنجش اوره استفاده نمود.

(توجه: هر ملکول از اوره دو ملکول  $\text{NAD}^+$  می‌نماید به علت اینکه هر ملکول اوره دو ملکول  $\text{NH}_3$  ایجاد می‌نماید).

### روش دی استیل منواکسیم (DAM)



در این روش آمونیاک تولید نمیشود، بلکه اوره با دی‌استیل-

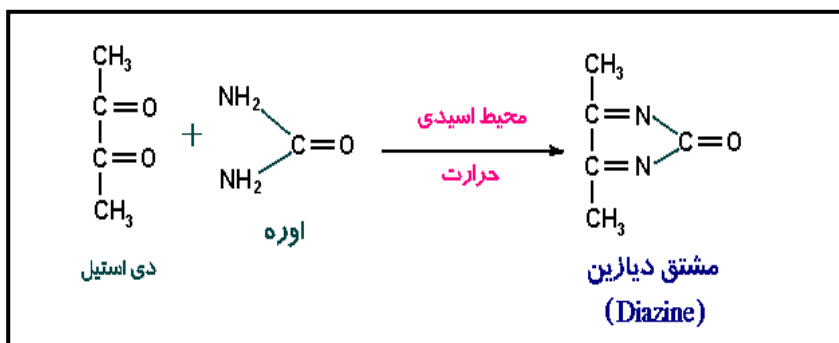
منواکسیم (DAM) واکنش می‌دهد. در واقع اوره با دی استیل

واکنش می‌دهد. از آنجاییکه دی استیل ناپایدارتر می‌باشد از DAM

استفاده می‌گردد که در هنگام انجام آزمایش، DAM تحت شرایط

اسیدی محیط تبدیل به دی استیل می‌گردد و این ترکیب با اوره

وارد واکنش می‌گردد و ایجاد مشتق دیازین (Diazine) می‌نماید که یک ترکیب رنگی می‌باشد (زرد رنگ) که ماگزیمم جذب آن در ۵۴۰ nm می‌باشد.



**نکته ۱:** تیوسمی کاربازید (Thiosemicarbazide) و یون  $\text{Fe}^{3+}$  که به محیط واکنشی افزوده می‌گردد، باعث پایداری رنگ و

نیز افزایش شدت رنگ می‌گردد و همچنین باعث کاهش حساسیت آن نسبت به نور می‌گردد.

**نکته ۲:** تداخل ناشی از هیدروکسیل آمین ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) با استفاده از مواد اکسیدان (مانند سولفات پتاسیم) برطرف می‌گردد.

**نکته ۳:** در غلظت‌های بالای اوره حساسیت روش کاهش می‌یابد.

از این روش می‌توان هم برای ارزیابی میزان اوره در پلاسما و هم در ادرار استفاده نمود.